

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA  
Dipartimento di Scienze Chirurgiche e  
Gastroenterologiche

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE GASTROENTEROLOGICHE E  
CHIRURGICHE DELLE MALATTIE INFIAMMATORIE E  
NEOPLASTICHE EPATOBILIARI E PANCREATICHE

CICLO XIX

**NUOVI APPROCCI PROTEOMICI  
PER L'IDENTIFICAZIONE DI POTENZIALI MARCATORI  
DI NEOPLASIE PANCREATICHE**

S.S.D. med/18

Coordinatore: Ch.mo Prof. Paolo Pederzoli



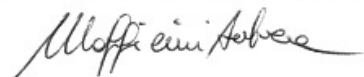
Tutor: Ch.mo Prof. Claudio Bassi



Correlatore: Dott. Claudio Sorio



Dottorando: Dott. Andrea Mafficini



28 Febbraio 2007

# INDICE

<b>ABSTRACT</b>	pag. 3
<b>Introduzione</b>	pag. 5
<b>Materiali e metodi</b>	pag. 8
<i>Raccolta dei surnatanti</i>	pag. 8
<i>Digestione enzimatica dei campioni</i>	pag. 8
<i>Analisi MudPIT</i>	pag. 8
<i>Gestione dei risultati della spettrometria</i>	pag. 9
<i>Analisi western blot</i>	pag. 10
<i>Immunoistochimica</i>	pag. 10
<i>Produzione di Xenografts in topi nudi</i>	pag. 10
<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)</i>	pag. 10
<i>Analisi dell'attività di metalloproteasi</i>	pag. 11
<i>Campioni di siero ed urina da pazienti e donatori sani</i>	pag. 11
<i>Saggio ELISA per l'analisi dei livelli serici e urinari di suPAR</i>	pag. 11
<b>Risultati</b>	pag. 13
<i>Determinazione delle condizioni e del momento ottimali per la raccolta dei surnatanti</i>	pag. 13
<i>Identificazione delle proteine rilasciate dalle cellule Suit-2</i>	pag. 14
<i>CSPG2/versican è secreto da Suit-2 e da cellule primarie di cancro del pancreas</i>	pag. 15
<i>Mac25/angiomodulina è una delle proteine secrete in maggior quantità dalle linee cellulari di pancreas ed è sovraespressa in tumori primitivi del pancreas</i>	pag. 16
<i>Proteine aggiuntive sono state rilevate in seguito ad attivazione delle cellule con PMA e ionomicina</i>	pag. 17
<i>I punteggi assegnati da SEQUEST a ciascuna proteina identificata con MudPIT correlano con la quantità della stessa nel campione</i>	pag. 18
<i>Mappe virtuali delle proteine identificate</i>	pag. 21
<i>Espansione dell'analisi a campioni clinici per il sistema uPA/uPAR mediante saggio ELISA</i>	pag. 22
<b>Discussione</b>	pag. 25
<b>Bibliografia</b>	pag. 30

## ABSTRACT

Lo sviluppo di approcci rapidi ed automatizzati come la tecnologia multidimensionale di identificazione proteica (MudPIT) sta rendendo la proteomica uno strumento sempre più efficiente per l'analisi delle proteine in miscele complesse, permettendo l'identificazione di nuovi marcatori biologici che sono di importanza critica per una migliore comprensione della biologia dei tumori e per rendere la sua rilevazione più precoce e meno invasiva. Lo scopo del presente studio era quello di identificare nuove proteine rilasciate dalle cellule di adenocarcinoma duttale del pancreas, usando piccole quantità di campione ed un sistema automatizzato; le evidenze sperimentali così ottenute sarebbero state utilizzate per verificare *in vitro* ed *in vivo*, con metodiche più tradizionali quali western blot, RT-PCR ed immunoistochimica, la presenza delle proteine selezionate come possibili marcatori. È stata dunque applicata la tecnologia MudPIT, che incorpora la cromatografia capillare bidimensionale e la spettrometria di massa in tandem, per l'analisi di piccole quantità di surnatanti privi di siero derivanti dalla coltura di cellule Suit-2 non trattate oppure attivate con esteri del forbolo e ionoforo. I potenziali marcatori prescelti sono stati valutati in altre linee cellulari di cancro del pancreas, adenocarcinomi primitivi e xenotrapiantati in topi *nu/nu*. L'analisi MudPIT effettuata su campioni di 10 µl di surnatanti ha permesso l'identificazione complessiva di 46 proteine tra cellule attivate e non trattate. Di queste proteine, 21 sono classificate come secrete sui database pubblicamente disponibili e 10 non erano state precedentemente associate al carcinoma duttale del pancreas. Questo gruppo comprende le proteine CSPG2/versican, Mac25/angiomodulina, IGFBP-1, HSPG2/perlecan, syndecan 4, FAM3C, APLP2, ciclofilina B, β2 microglobulina, ed ICA69. Le evidenze sperimentali che queste proteine siano rilasciate dalle cellule tumorali *in vivo* sono state ottenute, per CSPG2/versican e Mac25/angiomodulina, mediante immunoistochimica. L'analisi è stata eseguita tanto su tumori primitivi quanto su di un modello, consistente in cellule della linea Suit-2 incluse in una matrice amorfa (Matrigel®) e trapiantate per una settimana in topi atimici. Si è inoltre dimostrato, mediante il confronto tra cellule non trattate ed attivate con esteri del forbolo, che l'analisi MudPIT può fornire dati semiquantitativi correlati con la quantità relativa di proteina presente nel campione analizzato; anche quest'osservazione è stata convalidata mediante misurazione del diverso livello di espressione di tre proteine rispettivamente inibite (Mac25/angiomodulina), non modificate (CSPG2/versican) ed indotte (MMP-1). Si è poi

indagata, su una casistica di 100 pazienti con varie patologie pancreatiche, l'espressione di forme solubili di uPAR (suPAR), il cui ligando uPA era tra le proteine maggiormente indotte in seguito all'attivazione delle cellule *in vitro*. L'analisi è stata fatta utilizzando una metodica immunoenzimatica (saggio ELISA) su sieri ed urine dei casi disponibili presso la biobanca della clinica chirurgica dell'Università di Verona. E' stato riscontrato un significativo incremento dei valori di suPAR nei sieri di pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas rispetto alle altre patologie infiammatorie o neoplastiche del pancreas; i dati delle urine, pur se meno netti, indicano comunque una tendenza simile ed incoraggiano ad un incremento del numero di campioni sui quali effettuare ulteriori analisi. Confrontato con altre metodiche, dunque, MudPIT è stato in grado di fornire in modo rapido e riproducibile dati su di una serie di molecole rilasciate da cellule neoplastiche, che hanno quindi caratteristiche di sicuro interesse quali potenziali marcatori di malattia potenzialmente rilevabili nei liquidi biologici. Gli sviluppi futuri di tale approccio comprendono, oltre all'ampliamento dell'analisi MudPIT su un numero maggiore di linee cellulari, lo sviluppo di nuovi reagenti per l'identificazione quelle molecole per le quali essi non sono attualmente disponibili.

## Introduzione

Le cellule tumorali interagiscono con il microambiente che le circonda, e lo modificano, rilasciando una notevole quantità di proteine che includono fattori di crescita, proteinasi di matrice coinvolte nel processo di invasione tumorale, e fattori di motilità cellulare che sostengono la migrazione cellulare e la progressione delle metastasi. Altri fattori aggiuntivi, come citochine immunoregolatrici e molecole che modulano le interazioni tra cellule e con i substrati, sono coinvolte nella evasione immunologica, nell'invasione e nell'angiogenesi indotta dalla neoplasia<sup>1-3</sup>.

L'adenocarcinoma duttale del pancreas è una malattia letale con un tasso di sopravvivenza a 24 mesi dalla diagnosi inferiore al 5%. In questo scenario quanto mai difficile, l'identificazione delle proteine rilasciate dalle cellule tumorali può essere utile, sia per una migliore comprensione delle interazioni cancro-ospite sia per la ricerca mirata di nuovi bersagli di utilità diagnostica, prognostica o terapeutica.

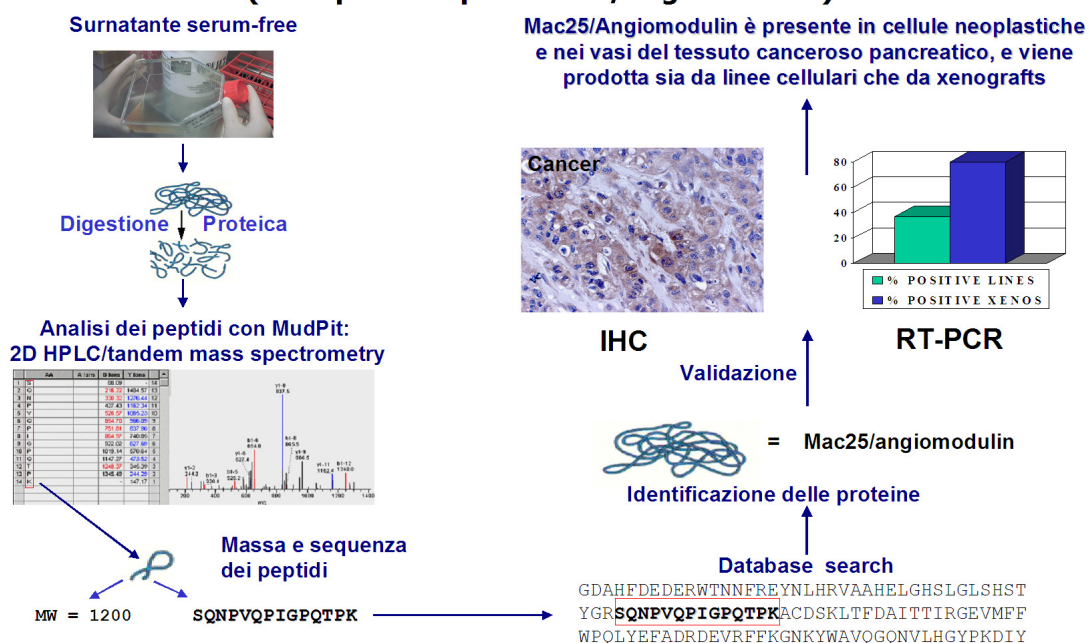
Negli ultimi anni, i DNA microarrays sono stati impiegati per l'analisi molecolare del cancro e hanno fornito profili globali dell'attività trascrizionale che riflettono l'origine<sup>4-6</sup>, lo stadio di sviluppo e la sensibilità ai farmaci<sup>7</sup> delle cellule tumorali studiate. Questo approccio è stato utilizzato anche per identificare putative proteine secrete in base all'analisi di degli mRNA legati sui poliribosomi<sup>8</sup> associati alle membrane. In ogni caso, l'approccio basato sull'RNA messaggero rappresenta una modalità di indagine indiretta che necessita sempre della riconferma dei dati a livello proteico.

Su questo piano, gli approcci diretti mediante tecniche di analisi del proteoma rappresentano un notevole passo in avanti<sup>9-11</sup>, ma diverse sfide tecniche si accompagnano all'analisi di miscele proteiche complesse<sup>11</sup>. L'approccio proteomico più classico è basato sull'elettroforesi bidimensionale in gel, dall'isolamento mediante rimozione dei frammenti di gel inglobanti la proteina di interesse e dalla successiva analisi mediante spettrometria di massa. L'approccio tramite elettroforesi bidimensionale ha un potere di risoluzione relativamente alto, limitato tuttavia dalla difficoltà nel rilevamento di certe classi di proteine. Tra queste sono incluse le proteine di membrana, a causa della loro bassa solubilità nel tampone di elettroforesi, proteine con una massa molecolare troppo bassa (inferiore a 10 KDa) o troppo alta (superiore a 200 KDa) che sfuggono al potere analitico dei gel utilizzati, oppure ancora proteine con un punto isoelettrico estremo (inferiore a 4 o superiore a 9), al di fuori dell'intervallo di pH che è possibile ottenere con le tecniche oggi

a disposizione. Infine, oltre al fatto che i tempi di analisi sono abbastanza lunghi a causa della necessità di rimuovere le aree di interesse per l'analisi con spettrometro di massa, un'ulteriore limitazione risiede nella scarsa capacità di rilevare ed analizzare le proteine meno abbondanti<sup>12</sup>.

Recentemente, è stata sviluppata una nuova metodica di indagine proteomica chiamata MudPIT (multidimensional protein identification technology)<sup>13</sup>, illustrata nello **schema 1**. Essa si basa sull'accoppiamento, mediante automatizzazione, di cromatografia capillare bidimensionale e spettrometria di massa in tandem (2DC-MS/MS); questa catena di processamento comporta la generazione di peptidi dalla digestione enzimatica di una mistura proteica complessa, la loro separazione mediante due colonne micro-HPLC sequenziali (una a scambio cationico, l'altra a fase inversa) e l'analisi diretta dei picchi eluiti mediante la spettrometria di massa in tandem<sup>13</sup>. L'identificazione delle proteine corrispondenti agli spettri ottenuti si ottiene poi attraverso una ricerca automatizzata su database mediante software apposito, come ad esempio l'algoritmo SEQUEST per la gestione degli spettri di massa<sup>13-15</sup>. Perciò l'approccio MudPIT comporta un significativo miglioramento rispetto all'analisi basata su gel, permettendo simultaneamente la separazione dei peptidi digeriti, il loro sequenziamento e l'identificazione delle proteine corrispondenti. Durante il dottorato di ricerca, l'approccio proteomico MudPIT è stato applicato per l'identificazione delle proteine rilasciate da cellule di cancro del pancreas. L'obiettivo era quello di identificare proteine rilasciate da linee cellulari in surnatanti di coltura e successivamente studiare il loro coinvolgimento nella biologia del cancro del pancreas, convalidando i dati ottenuti al MudPIT su di un pannello rappresentativo di linee cellulari e tumori primari.

## SCHEMA DI PROCESSO (Esemplificato per Mac25/angiomodulin)



**Schema 1.** Procedura adottata nel presente studio per individuare e convalidare le proteine rilasciate da cellule di adenocarcinoma duttale del pancreas. Le metodiche usate per la convalida dei risultati sono solo esemplificative; per altre proteine sono stati usati saggi diversi come l'analisi western blot o dell'attività enzimatica.

## Materiali e metodi

### *Raccolta dei surnatanti*

Le linee cellulari di adenocarcinoma del pancreas Suit-2, IMIM-PC1, IMIM-PC2, T3M4 e BI sono descritte in Moore *et al.*<sup>16</sup>, la linea MCC1 è stata stabilita nel nostro laboratorio<sup>17</sup>. I surnatanti sono stati raccolti seguendo il protocollo di Kratchmarova *et al.*<sup>18</sup> con minime modifiche. Le cellule sono state fatte crescere fino all'80% di confluenza in flasks da 150 cm<sup>2</sup> con terreno completo (RPMI 1640, 2 mM glutamina, 10%FBS), lavate gentilmente per sei volte con terreno privo di siero e incubate in 12 ml di terreno privo di siero per 18 ore. I surnatanti di coltura sono stati ultracentrifugati a 100'000 *g* per 2 ore a 4°C e sottoposti ad analisi. Per l'analisi dell'attivazione cellulare, le cellule Suit-2 sono state trattate con 100 ng/ml di forbol-miristato-acetato (PMA) e 100 nM ionomicina (Sigma, Milano, Italia).

### *Digestione enzimatica dei campioni*

A 50 µl di ciascun campione, contenenti 1 µg di proteina totale, è stata aggiunta tripsina modificata "sequencing grade" (Promega, Madison, WI, USA) con un rapporto enzima/proteina di 1:50. La miscela è stata incubata a 37°C in 100 mM bicarbonato d'ammonio, pH 8.0 per 14 ore. La reazione è stata quindi fermata mediante acidificazione con acido trifluoroacetico. Una seconda aliquota di ciascun campione è stata digerita con pepsina (Sigma, Milano, Italia) con rapporto 1:50 a temperatura ambiente in 100 mM acetato d'ammonio, pH3.0 per 4 ore ed immediatamente analizzata. Dieci µl della miscela peptidica ottenuta sono stati iniettati direttamente nel sistema MudPIT.

### *Analisi MudPIT*

Dieci µl della miscela peptidica ottenuta dalla digestione enzimatica dei campioni sono stati analizzati tramite microcromatografia bidimensionale accoppiata con uno spettrometro di massa a trappola ionica, usando il sistema ProteomeX (ThermoElectron, San Josè, CA), equipaggiato con l'interfaccia informatica Bioworks 3.1 per la gestione dei dati. In particolare, le miscele peptidiche sono state prima separate mediante cromatografia a scambio ionico (Biobasic-SCX column, 5 µm, 0.3 ID × 150 mm, ThermoHypersil, Bellofonte, PA, USA) usando sette fasi a concentrazione crescente di cloruro d'ammonio (0, 50, 100, 150, 200, 300, e 600 mM).

L'eluato di ciascuna fase è stato direttamente caricato sulla colonna a fase inversa



(Biobasic-C<sub>18</sub>, 0.180 ID × 100 mm, ThermoHypersil, Bellofonte, PA, USA) e separato con un gradiente di acetonitrile, essendo l'eluente A 0.1% acido formico in acqua e l'eluente B 0.1% acido formico in acetonitrile. Il profilo del gradiente era il seguente: 5% di soluzione B per 3 min, seguito da un gradiente lineare da 5 a 50% di B nell'arco di 40 min. I peptidi così eluiti sono stati analizzati direttamente con uno spettrometro di massa a trappola ionica LCQ<sub>XP</sub> equipaggiato con un ago in metallo (10 µm ID). Il capillare riscaldato era mantenuto a 160°C, lo spray ionico a 3.2 kV e il voltaggio del capillare a 67 V. Gli spettri sono stati acquisiti in modo positivo nell'intervallo 400-1600 m/z usando l'esclusione dinamica per l'analisi della spettrometria in tandem (energia di collisione 35%).

### *Gestione dei risultati della spettrometria*

Usando l'algoritmo SEQUEST (University of Washington, in licenza a ThermoElectron Corp.), gli spettri di massa prodotti sperimentalmente sono stati correlati alle sequenze peptidiche per comparazione con gli spettri di massa teorici nello human protein database scaricato dal sito della NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Dato che la confidenza nell'identificazione della proteina, in particolare usando dati da un singolo peptide, dipende dalla stringenza applicata per l'identificazione ed il raffronto del peptide, Un'alta stringenza è stata garantita nel modo seguente: per prima cosa i valori minimi scelti di Xcorr erano maggiori di 1.5, 2.0 e 2.5 per ioni rispettivamente a singola, doppia o tripla carica. In seconda istanza, la tolleranza nella ricerca della massa del peptide è stata regolata a 1.0 mentre, abitualmente, questo parametro viene mantenuto tra i 2 e i 3 Dalton<sup>19</sup>. La conferma che la stringenza applicata fosse ottimale è stata data da un ulteriore parametro di analisi, delCn (correlazione normalizzata), che nel nostro caso era migliore di 1.0, quando è considerato ottimale un valore superiore a 0.07<sup>19</sup>. Per l'identificazione di proteine partendo dall'analisi di un singolo peptide, sono stati applicati criteri stringenti in accordo con le linee guida di recente pubblicazione<sup>20</sup>. In particolare, solo il peptide con la migliore corrispondenza è stato preso in considerazione e solo se lo stesso peptide era rinvenuto in più spettri di massa. Inoltre, l'identificazione di una proteina da un singolo peptide è stata considerata valida solo se lo stesso era stato rilevato in tre di quattro analisi MudPIT effettuate. I dati in uscita dal programma SEQUEST sono stati trattati con l'algoritmo MAProMA (Multidimensional Algorithm Protein Map) per la comparazione delle liste proteiche, la valutazione delle abbondanze relative e la creazione di mappe bidimensionali virtuali<sup>21</sup>.

### *Analisi western blot*

Le proteine ottenute da 10 ml di surnatante di coltura privo di siero sono state precipitate mediante aggiunta, goccia a goccia, di acido tricloroacetico fino alla concentrazione finale del 10%, in agitazione a 4°C. Il campione è stato quindi centrifugato a 3000 *g* per 60 min e lavato tre volte con un eccesso di miscela acetone:metanolo 8:1. Il precipitato è stato asciugato a pressione atmosferica e sottoposto ad elettroforesi denaturante su gel di poliacrilamide. Le proteine separate sono state quindi trasferite mediante elettroblotting su una membrana di nitrocellulosa (GE healthcare, Milano, Italia); il controllo del trasferimento e dell'omogeneità dei campioni è stato eseguito colorando transitoriamente la membrana con rosso Ponceau. Gli anticorpi anti-angiomodulin #88<sup>22</sup> e anti-versican (clone 2-B-1, Seikagaku, Japan) sono stati usati alla concentrazione di 1 µg/ml. L'anticorpo secondario era un rabbit anti-mouse-HRP (GE healthcare, Milano, Italia) ed il segnale è stato ottenuto con il sistema di chemiluminescenza ECL (GE healthcare, Milano, Italia).

### *Immunoistochimica*

Sezioni di tessuto paraffinato da 5 µm sono state marcate con l'anticorpo anti-angiomodulin a 5 µg/ml e con l'anticorpo anti-versican a 0.5 µg/ml come descritto in Cattaneo *et al*, 2003<sup>23</sup>.

### *Produzione di Xenografts in topi nudi*

Le cellule Suit-2 ( $2 \times 10^6$ ) sono state risospese in 0.4 ml di Matrigel ed inoculate sotto cute nel fianco di topi svizzeri *nu/nu* di quattro settimane e del peso di 18-22g (Charles River, Milano, Italia). Dopo una settimana gli impianti sono stati rimossi, fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e sezionati per l'analisi immunoistochimica.

### *Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

L'RNA è stato estratto utilizzando il reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Milano, Italia). Un microgrammo di RNA totale è stato retrotrascritto in 20 µl con 100 ng di random hexamers e 200 unità di trascrittasi inversa SuperScript II (Invitrogen, Milano, Italia) a 42°C per un'ora. La PCR è stata eseguita come descritto in Cattaneo *et al*, 2003<sup>23</sup>. Come controllo dell'avvenuta trascrizione inversa, è stata eseguita sul cDNA l'amplificazione della β-actina per 25 cicli. I primers usati per amplificare versican erano: 5'-GGC TTT GAC CAG TGC GAT TAC-3' e 5'-CCA GCC ATA GTC ACA TGT CTC-3'.

### *Analisi dell'attività metalloproteasica*

I surnatanti sono stati centrifugati a 14'000 *g* per eliminare i frammenti cellulari. Cinque  $\mu$ l di 5x SDS sample buffer (5% SDS, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 25% glicerolo) sono stati aggiunti a 20  $\mu$ l di surnatante. I campioni sono stati corsi su di un gel di poliacrilamide-SDS contenente 1 mg/ml di gelatina (Sigma, Milano, Italia). Il gel è stato lavato due volte per 20 min con una soluzione 2.5% Triton X-100 a temperatura ambiente, incubato in 200 ml di tampone di attivazione (10 mM Tris-HCl, 1.25% Triton X-100, 5mM  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_2$ ) per 14 h a 37°C, colorato con blue di Coomassie e decolorato con una miscela di metanolo:acido acetico:acqua (50:10:40).

### *Campioni di siero ed urina da pazienti e donatori sani*

Sono stati utilizzati campioni di siero ed urina di 80 pazienti, affetti da varie patologie neoplastiche e non neoplastiche del pancreas, e da 102 donatori sani, disponibili presso la biobanca della clinica chirurgica dell'Università di Verona. I campioni erano stati precedentemente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C. Prima dell'analisi, i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente e centrifugati a 15'000 *g* per 5 minuti.

### *Saggio ELISA per l'analisi dei livelli serici e urinari di suPAR*

La forma solubile di uPAR (suPAR) è stata purificata da surnatanti di cellule CHO-suPAR e purificata tramite cromatografia di affinità come descritto in Masucci et al, 1991<sup>24</sup>. Le piastre nere da saggio immunologico (Nunc, Wiesbaden, Germania) sono state incubate per 16 ore a 4°C con 100  $\mu$ l/pozzetto di anticorpo monoclonale anti-uPAR R4 (1  $\mu$ g/ml, in 0.1 M tampone carbonato, pH 9.5)<sup>25</sup>. I pozzetti sono stati poi lavati tre volte con 300  $\mu$ l di tampone fosfato salino (PBS) contenente lo 0.1% di Tween-20, trattati per 30 minuti a 37°C con 100  $\mu$ l di albumina da siero bovino (BSA) 2% in PBS, lavati tre volte con PBS contenente lo 0.1% di Tween-20. I pozzetti sono stati quindi trattati per 2 ore a 37°C con 100  $\mu$ l di suPAR purificato, diluito a diverse concentrazioni in PBS con 1% di BSA e con i campioni. Dopo tre lavaggi con PBS, 0.1% Tween-20, i pozzetti sono stati incubati per 1 ora a 37°C con 100  $\mu$ l di anticorpo policlonale anti-uPAR SI369<sup>26</sup> (1  $\mu$ g/ml in PBS, 1% BSA). Dopo tre lavaggi con PBS, 0.1% Tween-20, i pozzetti sono stati incubati per 1 ora a 37°C con 100  $\mu$ l di anticorpo secondario goat anti-rabbit coniugato con HRP (GE Healthcare, Milano, Italia). Dopo tre lavaggi con PBS, 0.1% Tween-20, sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di soluzione substrato, contenente 5  $\mu$ M Amplex Red (Invitrogen, Milano, Italia) in

50 mM sodio fosfato, pH 7.4 con l'aggiunta di 10  $\mu$ l di  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 volumi. Dopo un'ora di incubazione al buio ed a temperatura ambiente, l'attività della perossidasi HRP è stata rilevata mediante fluorimetria usando un lettore per micropiastre Victor<sup>3</sup> (Perkin Elmer, Milano, Italia). La lunghezza d'onda d'eccitazione usata era 530-560 nm, la fluorescenza è stata raccolta a 590 nm. La lettura di ogni campione è stata corretta mediante sottrazione della fluorescenza di fondo.

## Risultati

L'analisi MudPIT effettuata sui surnatanti privi di siero prodotti da cellule Suit-2, sia in assenza di stimoli che dopo attivazione con PMA/ionomicina ha permesso l'identificazione di 46 proteine (Tabelle 1 e 2). I risultati sono stati validati per un gruppo di proteine selezionate espandendo l'analisi, con metodi tradizionali, su un pannello di linee cellulari di cancro del pancreas. Le evidenze sperimentali del fatto che queste cellule rilascino le suddette proteine *in vivo* sono state ottenute mediante immunisto chimica sia su cellule primarie di cancro del pancreas, sia su di un modello sperimentale consistente in cellule della linea Suit-2 incluse in una matrice amorfa e poi impiantate in topi atimici.

E' stato anche dimostrato che MudPIT è in grado di rilevare variazioni nella quantità delle proteine secrete, dopo l'attivazione delle cellule con esteri del forbolo, e che queste variazioni quantitative si riflettono nei punteggi assegnati dal software SEQUEST alle proteine identificate. MudPIT potrebbe quindi permettere anche una valutazione quantitativa delle proteine presenti in un campione.

### *Determinazione delle condizioni e del momento ottimali per la raccolta dei surnatanti.*

Per determinare il trattamento ed il tempo ottimali per la raccolta dei surnatanti, l'analisi MudPIT è stata inizialmente applicata a diverse preparazioni differenti.

Ne è risultato che le condizioni ottimali si ottenevano seguendo il protocollo di Kratchmarova *et al*, 2002<sup>18</sup> con minime modifiche, consistente in una serie di lavaggi gentili seguiti da una incubazione di 18 ore in terreno di coltura privo di siero. Il punto di raccolta alle 18 ore era l'incubazione più lunga in grado di generare un buon segnale all'analisi MudPIT in assenza di evidenti segnali che indicassero danno o morte cellulare, assenza confermata anche tramite conta cellulare con trypan blue e dalla mancanza, nella lista delle proteine rivelate all'analisi MudPIT, delle heat shock proteins HSP9A e HSP70, visibili invece dopo 24 e 36 ore di incubazione. Le proteine suddette sono espresse in caso di stress cellulare e ne sono anche indicative.

NCBI GI number	Proteina	Pep	%Seq	pI	MW (Da)	cellular location
4758082	CSPG2/versican (chondroitin sulfate proteoglycan 2)	9	7	4.45	265050	S
4505215	MMP1 (matrix metalloproteinase 1 preproprotein)	6	16	6.47	54008	S
5031863	Mac-2 BP (Mac-2-binding protein; serum protein 90K)	5	13	5.13	65332	S
7427517	HSPG2/perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2)	5	2	6.1	469388	S
2135211	Mac25/angiomodulin/IGFBP-rP1/IGFBP7	4	19	8.4	28756	S
87509	SERPINE2 (protease Nexin 1)	4	14	9.42	43961	S
4507467	TGFBI (transforming growth factor, beta-induced)	4	10	7.62	74681	S
4502905	Clusterin (apolipoprotein J)	3	11	5.89	52495	S
4505219	MMP7 (matrix metalloproteinase 7)	3	16	7.73	29678	S
7661714	FAM3C (predicted osteoblast protein)	3	23	8.52	24681	S
4504615	IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein 1)	1	6	5.11	27905	S
4507508	TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1)	1	5	8.46	23171	S
4502147	APLP2 (amyloid beta (A4) precursor-like protein 2)	2	5	4.73	86956	M/S
7446012	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	4	9	6.98	80815	C/S
16162032	Cyclophilin B (hypothetical protein XP_057192)	3	19	9.33	22743	C/S
1346343	CK 1 (keratin, type II)	4	9	8.16	66018	C
4501885	Beta actin	3	18	5.29	41737	C
7669492	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2	11	8.57	36054	C
4501883	Alpha 2 actin	2	9	5.24	42010	C
5031857	Lactate dehydrogenase A	1	5	8.44	36689	C
4826908	Phosphoinositide-3-kinase	1	3	6.1	81624	C
17380170	Poly(A) polymerase gamma	1	3	9.12	82806	C
4826898	Profilin 1	1	11	8.44	15055	C
4507553	Tropomodulin	1	6	5.03	40570	C
9628503	Regulatory protein E2	1	4	8.39	44333	C
10181098	Choline acetyltransferase isoform	1	2	8.86	82609	C
7662130	KIAA0443 gene product	1	2	4.64	156837	C
5032057	S100 calcium-binding protein A11	2	24	6.56	11741	C/N
5032221	Voltage-dependent anion channel 3	2	8	8.84	30659	C (mit)
1172554	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	5	23	6.32	38093	C (mit)

**Tabella 1:** Proteine identificate nei surnatanti privi di siero di cellule Suit-2 non stimolate: Pep, numero di peptidi identificati; %Seq, percentuale della proteina risolta; pI, punto isoelettrico; MW, massa molecolare. La localizzazione cellulare si basa sui database Human Protein Reference (<http://www.hprd.org>) e GeneCards (<http://bioinformatics.Weizmann.ac.il>): S, secreta; M, membrana; C, citoplasmica; N, nucleare).

### *Identificazione delle proteine rilasciate dalle cellule Suit-2*

Ogni analisi MudPIT dei campioni digeriti ha prodotto sette cromatogrammi di fase inversa, corrispondenti a ciascuna fase di eluizione dalla colonna a scambio ionico con concentrazione via via crescente di cloruro d'ammonio (0, 50, 100, 150, 200, 300, e 600 mM). I peptidi eluiti dalle colonne sono stati immediatamente rediretti allo spettrometro di massa dove sono stati ionizzati, selezionati per massa e frammentati. Questa procedura ha permesso l'identificazione di molti peptidi, associati poi alle proteine corrispondenti grazie al programma SEQUEST. L'analisi dei surnatanti di cellule Suit-2 non trattate, eseguita in quattro repliche (a partire dalle colture cellulari), ha dato risultati consistenti con un

coefficiente di variazione di 3.2% e 10% rispettivamente per tempi di migrazione e area dei picchi.

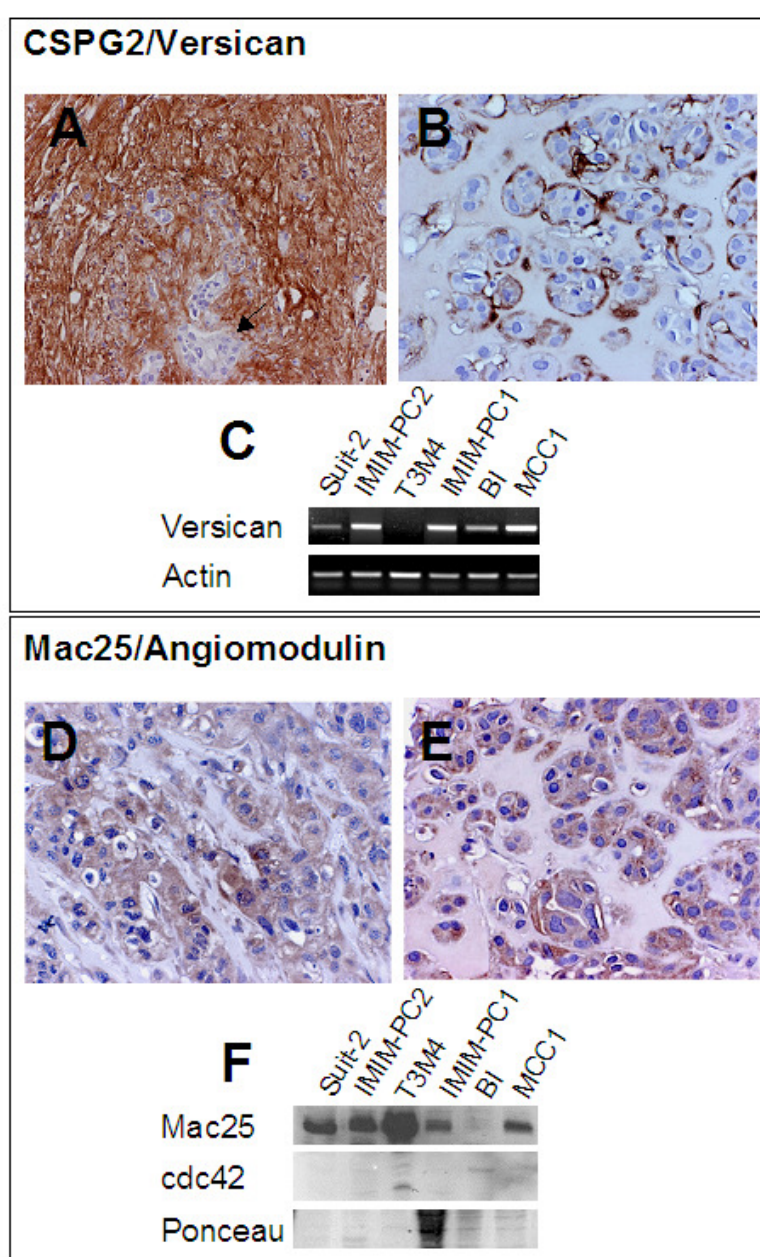
Grazie a questi risultati, è stato possibile identificare le 30 proteine elencate nella **Tabella 1**; è riportata anche la loro localizzazione cellulare secondo i dati disponibili sui database pubblici. Un sottogruppo di queste proteine non era mai stato associato prima al cancro del pancreas; di queste fanno parte CSPG2/versican e Mac25/angiomodulina.

*CSPG2/versican è secreto da Suit-2 e da cellule primarie di cancro del pancreas*

Tramite l'utilizzo della RT-PCR, è stato possibile rilevare l'espressione dell'RNA messaggero di CSPG2/versican in cinque delle sei linee cellulari (Suit-2, IMIM-PC1, IMIM-PC2, T3M4 BI e MCC1) indagate (**Fig. 1C**). Secondo i risultati dell'immunoistochimica, in tumori primitivi del pancreas CSPG2/versican è presente in elevata quantità in corrispondenza dello stroma presente nella neoplasia mentre le cellule tumorali sono risultate negative (**Fig. 1A**). Per dimostrare che le cellule neoplastiche di pancreas rilasciano CSPG2/versican *in vivo*, è stato allestito un modello sperimentale consistente in cellule Suit-2 risospese in una matrice extracellulare (Matrigel®). Questa sospensione gelatinosa è stata inoculata nel fianco di topi *nu/nu* e lasciata ad incubare per una settimana. L'impianto, dopo essere stato rimosso, fissato in formalina ed incluso in paraffina, è stato analizzato con metodica immunoistochimica. L'analisi ha dimostrato che il proteoglicano si accumula all'interfaccia tra le cellule e la matrice inerte prima di diffondere nella matrice stessa (**Fig. 1B**). Le cellule, anche in questo caso, non vengono marcate dall'anticorpo e rimangono negative, indicando una bassa concentrazione intracellulare del proteoglicano, compatibile con una rapida secrezione. Per controllare se questi risultati fossero dovuti ad un artefatto e confermare che cellule tumorali primarie del pancreas producono CSPG2/versican, è stata analizzata l'espressione del proteoglicano in questione a livello di RNA messaggero in 18 campioni arricchiti in cellule tumorali, mediante RT-PCR. I campioni includevano tre ago-aspirati da tumori primari e 15 xenografts ottenuti mediante impianto di tessuto tumorale primario in topi *nu/nu*<sup>27, 28</sup>. L'RNA messaggero di versican è stato rilevato in tutti e tre i campioni da ago-aspirati ed in 14 dei 15 campioni da xenografts. Nessuna amplificazione si è avuta dai tessuti murini usando gli stessi primers, il che elimina l'ipotesi di falsi positivi.

*Mac25/angiomodulina è una delle proteine secrete in maggior quantità dalle linee cellulari di pancreas ed è sovraespressa in tumori primitivi del pancreas.*

L'analisi western blot ha dimostrato che cinque delle sei linee cellulari pancreatiche analizzate rilasciano Mac25 nel surnatante (**Fig. 1F**); la presenza della proteina all'interno delle cellule è stata confermata mediante immunoprecipitazione e western blot dei lisati cellulari. L'analisi immunoistochimica ha mostrato che Mac25 è chiaramente espressa sia in cellule tumorali pancreatiche primarie (**Fig. 1D**), sia in cellule Suit-2 xenotrapiantate (**Fig. 1E**). Nei tessuti tumorali, la positività per Mac25 era associata anche ai piccoli vasi. Nel pancreas sano, Mac25 è stata rilevata nelle isole di Langerhans, mentre un debole segnale era visibile nei duttuli.



**Figura 1.** Espressione di CSPG2/versican e Mac25/angiomodulina in adenocarcinoma pancreatico.

**A)** L'Immunohistochemica di adenocarcinoma pancreatico primario per versican mostra uno stroma peritumorale fortemente positivo, mentre le cellule cancerose sono negative (freccia). **B)** Lo stesso tipo di reattività si ritrova nelle cellule Suit-2 impiantate in topi *nu/nu* dopo inclusione in Matrigel: l'interfaccia cellule-matrice si colora intensamente mentre le cellule restano negative. Questo suggerisce che le cellule producano ed immediatamente rilascino il proteoglicano. **C)** L'analisi RT-PCR mostra la presenza del trascritto di versican in cinque delle sei linee cellulari usate; solo T3M4 risulta negativa. L'espressione dell'actina è mostrata per indicare un'uguale quantità di partenza di cDNA totale.

**D)** Immunohistochemica per Mac25 su tumore primitivo, con le cellule cancerose che mostrano una forte colorazione citoplasmica.

**E)** Immunohistochemica su cellule Suit-2 impiantate come sopra: vi è colorazione sia del citoplasma cellulare che della matrice amorfa.

**F)** Analisi western blot dei surnatanti delle sei linee cellulari: Mac25 risulta rilasciata da cinque delle sei linee; anti-cdc42 è stato usato come controllo negativo e la colorazione con ponceau mostra il caricamento di quantità simili di proteina totale in ogni corsia.



*Proteine aggiuntive sono state rilevate in seguito ad attivazione delle cellule con PMA e ionomicina.*

Dopo l'attivazione delle cellule con PMA/ionomicina, l'analisi MudPIT dei relativi surnatanti ha identificato in modo consistente, da quattro colture indipendenti, le 16 proteine elencate in **Tabella 2**, in aggiunta a quelle già rilevate in assenza di stimoli. Tra queste, sei sono classificate come proteine secrete nei database pubblici. L'identificazione di un numero maggiore di proteine classificate come citosoliche in questo secondo esperimento è dovuta più probabilmente all'effetto dell'attivazione che ad un aumento di danno o morte cellulare; questa interpretazione è supportata anche dalla conta con trypan blue delle colture cellulari. Inoltre, la classificazione nei database di determinate proteine come citosoliche non significa in senso assoluto che esse non possano anche essere rilasciate nel surnatante. Per esempio la proteina vimentina, classificata come citoplasmica nei database, è stata recentemente identificata come proteina secreta dai macrofagi<sup>29</sup>. Come ulteriore osservazione, si è visto che diverse proteine identificate sia in assenza di trattamenti che nei campioni trattati avevano subito una variazione nel punteggio assegnato dal programma SEQUEST. Questo ha suggerito l'ipotesi che questi valori di punteggio possano essere correlabili a variazioni quantitative delle proteine rilevate nelle due differenti condizioni.

NCBI GI number	Proteina	Pep	%Seq	pI	MW	Cellular location
137112	uPA (urokinase-type plasminogen activator precursor)	4	13	8.78	48526	S
135717	TSP1 (thrombospondin 1)	4	6	4.71	129413	S
4757826	Beta-2-microglobulin	2	16	6.05	13715	M/S
4506861	Syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	1	7	4.39	21608	M/S
135155	Syndecan-1	1	6	4.53	32477	M/S
729800	ICA69 (islet cell autoantigen p69)	1	4	5.5	54673	C/S
105583	CD44E protein, epithelial	1	3	5.29	53597	M
5031635	Cofilin 1	2	27	8.22	18503	C
285975	Human rab GDI	2	8	5.94	50664	C
462325	Heat shock 70 kDa protein 1 (HS71)	2	6	5.48	70053	C
4507953	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan5-monooxygenase activation protein (14-3-3zeta)	1	12	4.73	27745	C
7657667	Ubiquitin-like 4	1	10	8.71	17777	C
107560	Ras inhibitor (clone JC265)	1	4	5.49	54385	C
4503439	E2F transcription factor 6	1	6	5.35	31844	C/N
11359932	Hypothetical protein DKFZp434C0917	1	16	8.03	15551	?
743789	Probable succinate--CoA ligase (GDP-forming)	1	10	6.6	20895	?

**Tabella 2:** Proteine identificate, in aggiunta a quelle della tabella 1, nei surnatanti di Suit-2 dopo attivazione con PMA-ionomicina: Pep, numero di peptidi identificati; %Seq, percentuale della proteina risolta; pI, punto isoelettrico; MW, massa molecolare. La localizzazione cellulare si basa sui database Human Protein Reference (<http://www.hprd.org>) e GeneCards (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il>): S, secreta; M, membrana; C, citoplasmica; N, nucleare).

*I punteggi assegnati da SEQUEST a ciascuna proteina identificata con MudPIT correlano con la quantità della stessa nel campione.*

L'algoritmo SEQUEST assegna ad ogni proteina che viene identificata un punteggio; questo formalmente corrisponde ad un indice di correlazione nel confronto tra gli spettri sperimentali e quelli teorici ottenuti dai database<sup>15</sup>. Tuttavia le variazioni di questi punteggi, osservate per diverse proteine nei surnatanti di cellule Suit-2 attivate rispetto a quelli di cellule non stimolate, suggerivano che i valori dei punteggi di SEQUEST potessero essere correlati alle effettive quantità delle proteine nei campioni analizzati. In effetti, l'attivazione delle cellule induce variazioni nella sintesi e secrezione delle proteine che dovrebbero essere rilevabili dall'analisi MudPIT, tanto è vero che nei campioni di cellule attivate è stato possibile rilevare sia proteine non rilevabili nei campioni da cellule non trattate, sia variazioni nei punteggi di un sottoinsieme delle proteine già identificate in assenza di stimoli, con un coefficiente di variazione del 15% tra le quattro repliche. Questi risultati sono riportate in **Tabella 3**, dove è mostrato il confronto dei punteggi assegnati da SEQUEST a proteine presenti sia nei campioni da cellule non trattate che in quelli da cellule attivate, affiancati dalle variazioni relative calcolate.

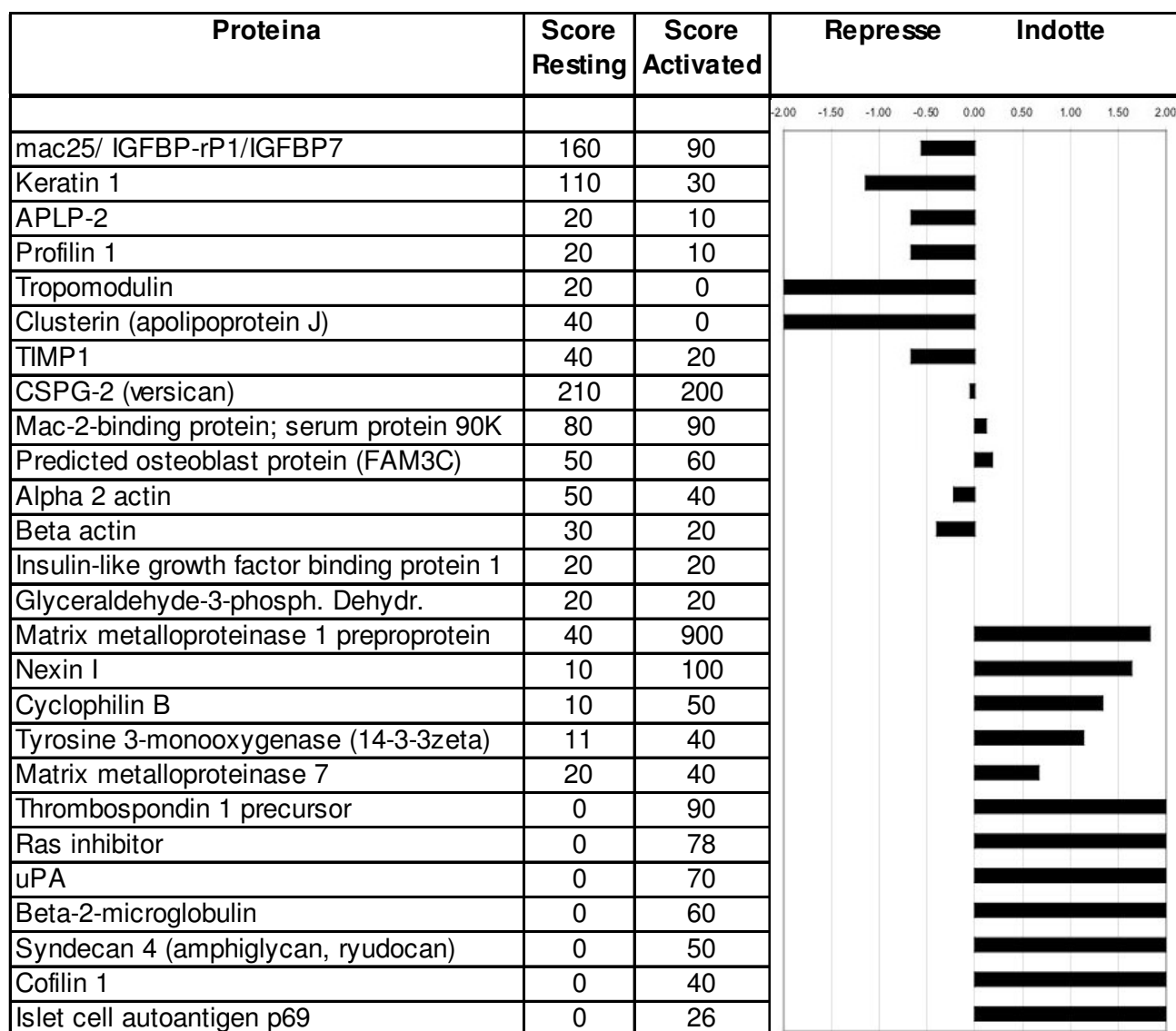
In particolare è stata applicata la formula  $(A-R)/[(A+R)\times 0.5]$  per valutare le differenze tra cellule attivate e non. In esplicito, la differenza  $(A-R)$  tra i punteggi per una data proteina in cellule attivate (A) e non attivate (R) è divisa per la media dei due valori  $(A+R)\times 0.5$ . Usando questa formula, quando A è uguale a R il risultato è zero, che corrisponde a nessuna variazione nei livelli di espressione. D'altra parte, quando la proteina non è espressa nel campione attivato ( $A=0$ ), il risultato sarà -2.0, mentre se la proteina è inespressa nel campione non attivato ( $R=0$ ) il risultato sarà +2.0. In questo modo, tutti i valori intermedi saranno nell'intervallo delimitato da questi due estremi e corrisponderanno a diversi gradi di variazione nei livelli di espressione. Allo scopo di selezionare solo le variazioni significative ed eliminare la possibilità che queste fossero dovute ad errore sperimentale nelle analisi, è stato considerato come soglia di accettazione il valore di  $\pm 0.5$  poiché questo valore corrisponde ad una variazione di punteggio del 25%  $[(0.5/2)\times 100]$ , che è ben superiore alla variabilità sperimentale calcolata (15%). Sono state quindi catalogate come sopresse le proteine con un valore inferiore a -0.5, mentre quelle con un valore superiore a +0.5 sono state considerate come indotte dall'attivazione.

Per verificare sperimentalmente la correlazione tra i punteggi assegnati da SEQUEST e la concentrazione delle corrispondenti proteine nei surnatanti, sono state scelte tre proteine:

Mac25/angiomodulina, CSPG2/versican ed MMP-1, i cui valori erano rispettivamente diminuiti, immutati e accresciuti nei campioni da cellule Suit-2 attivate. Sono stati estratti i cromatogrammi corrispondenti a ciascun peptide identificato al MudPIT per queste tre proteine ed è stata calcolata per ognuno l'area sottesa, che è un parametro correlato alla quantità del peptide stesso. I valori di punteggio ed i loro rapporti (A/R) per le tre proteine sono stati comparati con le aree dei picchi ed i rispettivi rapporti (A/R) per ciascuno dei peptidi corrispondenti. I dati risultanti sono stati raccolti in **Tabella 4**, dove i punteggi assegnati alle proteine ed i loro rapporti (A/R) sono comparati con le aree dei picchi ed i loro rapporti (A/R).

E' stata trovata una buona correlazione tra i rapporti dei punteggi assegnati da SEQUEST alle proteine e quelli tra le aree dei picchi dei peptidi rilevati per le tre proteine analizzate. Nelle cellule attivate, i punteggi associati a Mac25 hanno mostrato una diminuita quantità di proteina in base al rapporto A/R (0.56), in buon accordo con i rapporti tra le aree dei picchi dei peptidi T<sub>98-114</sub> (0.57) e T<sub>227-240</sub> (0.61). Il rapporto A/R dei punteggi di CSPG2/versican (0.95) era a sua volta in buon accordo con i rapporti tra le aree dei picchi dei peptidi T<sub>80-92</sub> (1.15) e T<sub>101-119</sub> (1.02). Infine, MMP-1 ha mostrato un aumento sia nel rapporto A/R tra i punteggi (22.5) che in quelli tra le aree dei picchi dei suoi peptidi triptici T<sub>137.151</sub> (20.0) e T<sub>348.362</sub> (23.0).

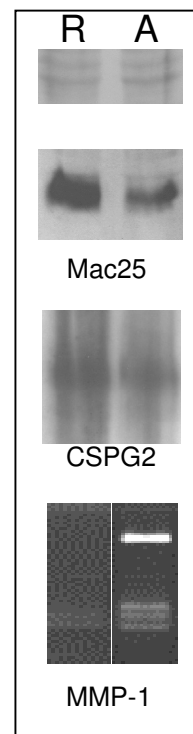
La relazione tra punteggi SEQUEST e quantità della proteina corrispondente in soluzione è stata ulteriormente confermata da saggi specifici per le tre proteine considerate. Come è visibile nelle figure associate alla Tabella 4, l'analisi western blot ha confermato la diminuita e invariata quantità, nelle cellule attivate, rispettivamente di Mac25/angiomodulina e CSPG2/versican. Infine, con un saggio funzionale che misura la quantità di attività metalloproteasica nei surnatanti rispettivamente di cellule non stimolate e attivate, si è confermata la presenza di una maggiore attività metalloproteasica nel campione derivato da cellule attivate, così come suggerito dall'analisi dei punteggi sopra riportata. E' quindi possibile concludere che il valore dei punteggi assegnati da SEQUEST a ciascuna proteina identificata è correlato alla quantità della proteina in questione nella soluzione analizzata.



**Tabella 3:** confronto della abbondanze relative delle proteine in cellule Suit-2 non trattate o attivate con PMA-Ionomicina. Le barre rappresentano i rapporti espressi tramite la formula  $(A-R)/[(A+R) \times 0.5]$ , dove A è il punteggio (score) in cellule attivate ed R il punteggio in cellule non trattate. Si considerano represses le proteine con un rapporto inferiore a  $-0.5$ , immutate quelle con rapporto compreso tra  $-0.5$  e  $+0.5$  ed indotte quelle con un rapporto superiore a  $+0.5$ . I dati sono estratti da un esperimento rappresentativo dei quattro svolti.

Proteina	Suit-2 Resting	Suit-2 Activated	Rapporto* (A/R)	R	A
<b>Mac25</b>					
Punteggio SEQUEST	160	90	0.56		
Area picco peptide (T98-114) AGAAAGGPGVSGVVCK	114	65	0.57		
(T227-240) HEVTGWVLVSPPLSK	183	112	0.61		
<b>CSPG2/versican</b>					
Punteggio SEQUEST	210	200	0.95		
Area picco peptide (T80-92) ETTVLVAQNNGNIK	104	120	1.15		
(T101-119) VSVPTHPPEAVGDASLTWK	163	167	1.02		
<b>Matrix Metalloproteinase 1</b>					
Punteggio SEQUEST	40	900	22.5		
Area picco peptide (T137-151) AFQLWSNVTPLTFTK	15	300	20.0		
(T348-362) YWAVQGQNVLHGYPK	50	1150	23.0		

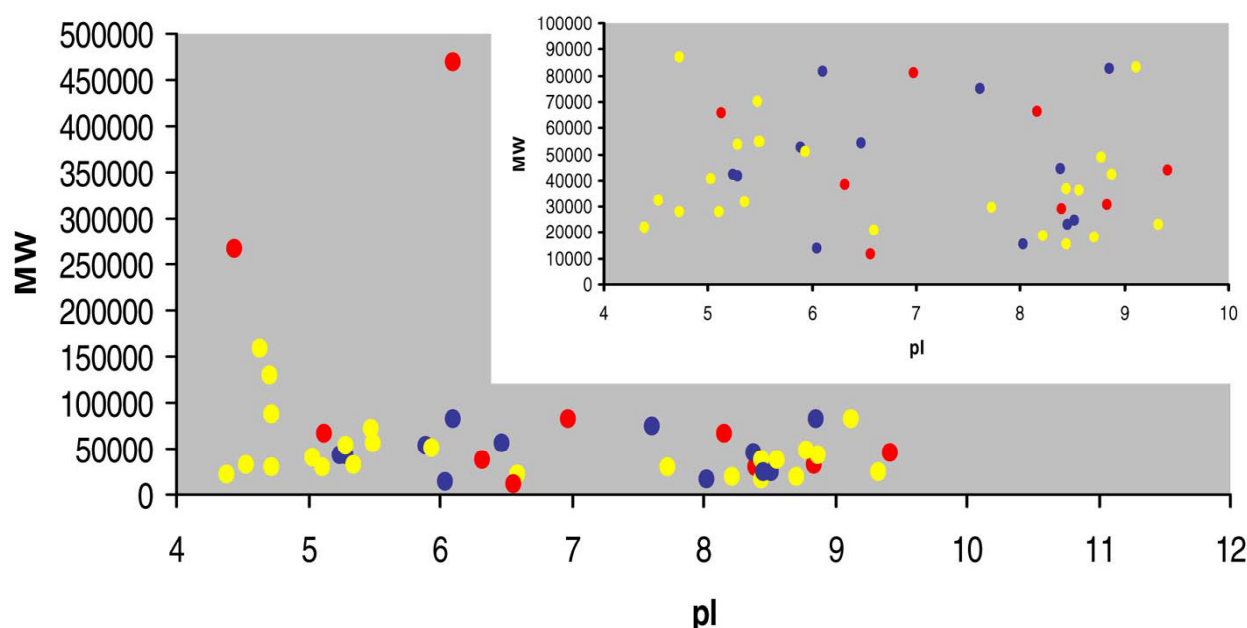
\* A/R, Activated/Resting.



**Tabella 4.** Correlazione tra i valori di punteggio SEQUEST, le aree dei picchi dei peptidi e la quantità di proteina nel campione. Le figure a destra, dall'alto al basso, illustrano: la colorazione del campione con rosso ponceau, a dimostrare il caricamento di quantità uguali di proteine totali nelle due corsie; immunoblotting rispettivamente con anticorpo anti-Mac25 ed anti-versican; zimogramma misurante l'attività gelatinolitica, dove le bande bianche identificano le aree di idrolisi della gelatina da parte di enzimi contenuti nel campione.

#### *Mappe virtuali delle proteine identificate.*

Per visualizzare i dati del programma SEQUEST in un formato più maneggevole, è stato sviluppato il software MAProMA (multidimensional algorithm protein map), che automaticamente visualizza in grafico le proteine usando come coordinate cartesiane la massa molecolare (MW) ed il punto isoelettrico (pI) di ciascuna<sup>21</sup>. Inoltre, viene assegnato un codice di colore basato sui punteggi SEQUEST: proteine con punteggio inferiore a 20 vengono segnate come bollini gialli, quelle con punteggio compreso tra 20 e 60 come bollini blu ed infine quelle con punteggio superiore a 60 come bollini rossi. Questo permette una visualizzazione sinottica dei profili proteici raccolti tramite una mappa bidimensionale virtuale (**figura 2**). Oltretutto, la rappresentazione così ottenuta dei risultati MudPIT evidenzia immediatamente le proteine con un'alta massa molecolare o con un punto isoelettrico estremo, come nel caso delle due proteine in figura aventi una massa molecolare predetta rispettivamente di 260 e 460 KDa e che corrispondono a CSPG2/versican ed a HSPG2/perlecan. Simili proteine non sono risolvibili con le metodiche basate su gel proprio a causa delle loro caratteristiche fisico-chimiche.

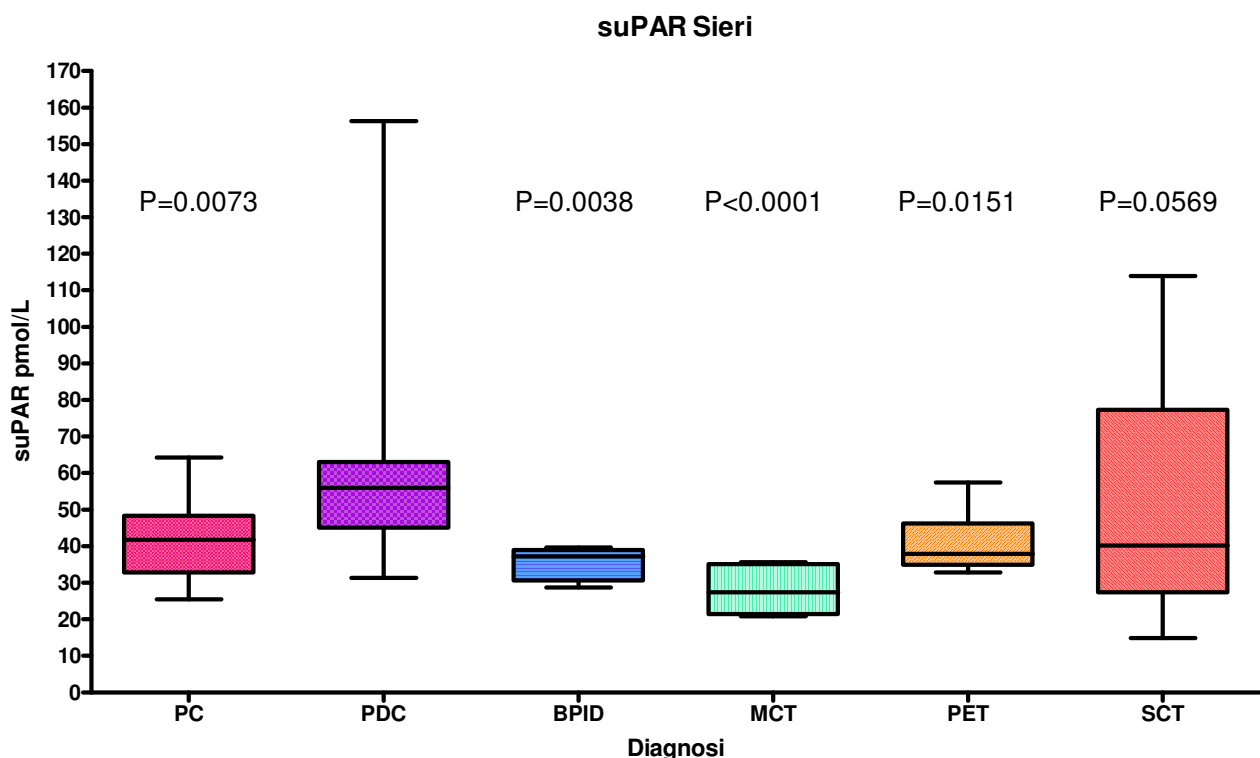


**Figura 2.** Esempio di mappa bidimensionale virtuale generata da MAProMA. La mappa è ottenuta usando come coordinate cartesiane il punto isoelettrico (pI) e la massa molecolare (MW) delle proteine listate nelle tabelle 1 e 2. Il colore di ogni punto è legato al punteggio SEQUEST ottenuto dalla proteina correlata: giallo < 20, rosso > 60, e blu da >20 a <60. Il riquadro più piccolo mostra un dettaglio comprendente solo proteine di massa molecolare inferiore a 100 Kda. I parametri MW e pI sono ricavati dal sito web Swiss-Prot o dallo stesso programma SEQUEST.

#### *Espansione dell'analisi a campioni clinici per il sistema uPA/uPAR mediante saggio ELISA.*

Nell'impiego di tecniche di analisi quali MudPIT, il punto di arrivo atteso è l'identificazione di potenziali marcatori ed il passaggio più delicato è sicuramente quello dal campione raccolto *in vitro* ad una casistica clinica. Poiché, tra le diverse molecole rilasciate dalle cellule Suit-2 attivate, uPA era risultata tra le maggiormente espresse, e dato che il sistema formato da uPA e dal suo recettore uPAR corrisponde ai criteri fissati per la scelta del potenziale marcatore, il sistema uPA/uPAR è stato designato per lo screening di campioni clinici. In particolare è stata considerata la forma solubile del recettore uPAR (suPAR) rilasciata in seguito al legame con uPA ed all'attività proteolitica di quest'ultimo. Lo screening è stato effettuato su una banca di sieri ed urine comprendente 45 individui con diagnosi di adenocarcinoma duttale, 7 con cistadenocarcinoma mucinoso, 6 con cistadenoma sieroso, 7 con tumori neuroendocrini, 10 con pancreatite cronica e 5 con infiammazioni delle vie biliari e pancreatiche. Come gruppo di controllo sono stati raccolti i sieri e le urine di 102 donatori sani. Come primo dato, è stato possibile rilevare che nel gruppo dei donatori sani i valori di suPAR erano molto inferiori a quelli dei pazienti ( $P > 0.001$ ), sia per quanto riguarda i sieri che le urine. Passando poi a confrontare i diversi tipi di diagnosi, l'analisi statistica ha rilevato che i valori di suPAR nei sieri (**Figura 3**) dei

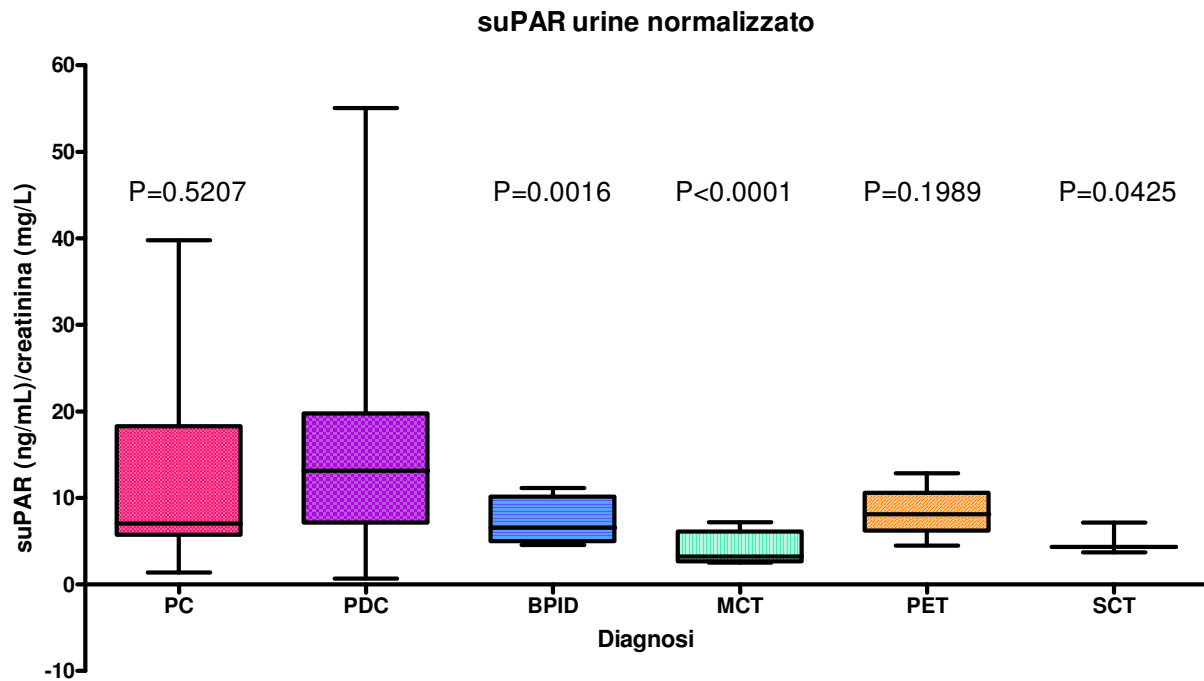
pazienti affetti da adenocarcinoma duttale sono significativamente più elevati di quelli da pazienti con cistadenocarcinoma mucinoso ( $P<0.0001$ ), con tumori neuroendocrini ( $P=0.0151$ ), con pancreatite cronica ( $P=0.0073$ ) e con infiammazioni biliari-pancreatiche ( $P=0.0038$ ). Il dato relativo al confronto tra adenocarcinoma duttale e cistadenoma sieroso ( $P=0.0569$ ), al limite superiore della significatività, è comunque viziato da una distribuzione non normale causata da un unico dato molto elevato; questo potrebbe suggerire la necessità di verificare la diagnosi e il follow-up del paziente da cui tale dato è stato ottenuto.



**Figura 3.** Confronto tra i valori serici di suPAR tra pazienti affetti da diverse malattie pancreatiche: PC, pancreatite cronica; PDC, carcinoma duttale del pancreas, BPID infiammazioni biliari-pancreatiche; MCT, cistadenocarcinoma mucinoso; PET, tumori endocrini del pancreas; SCT, cistadenoma sieroso.

Un simile andamento è stato riscontrato anche nelle urine, in cui il valore rilevato di suPAR (ng/ml) è stato normalizzato con il valore della creatinina (mg/l), poiché risulta che il rilascio di suPAR vari seguendo l'intensità del catabolismo urinario. Come è visualizzato in **figura 4**, i valori urinari di suPAR nei pazienti affetti da adenocarcinoma duttale sono significativamente più elevati di quelli da pazienti con cistadenocarcinoma mucinoso ( $P<0.0001$ ), con infiammazioni biliari-pancreatiche ( $P=0.0016$ ) e cistadenoma sieroso

( $P=0.0425$ ). Il confronto con pazienti affetti da pancreatite cronica ( $P=0.5207$ ) e tumori neuroendocrini ( $P=0.1989$ ) non raggiunge, purtroppo, valori significativi rimandando all'analisi dei valori serici come unico parametro al momento considerabile.



**Figura 4.** Confronto tra i valori urinari di suPAR, normalizzati contro i rispettivi valori urinari di creatinina, tra pazienti affetti da diverse malattie pancreatiche: PC, pancreatite cronica; PDC, carcinoma duttale del pancreas, BPID infiammazioni biliari-pancreatiche; MCT, cistadenocarcinoma mucinoso; PET, tumori endocrini del pancreas; SCT, cistadenoma sieroso.



## Discussione

L'analisi MudPIT<sup>13, 14</sup> è stata utilizzata allo scopo di identificare le proteine rilasciate da cellule di cancro del pancreas *in vitro*. Questo tipo di indagine, effettuata su campioni di surnatanti privi di siero derivati dalla coltura di cellule Suit-2 ha complessivamente identificato in modo consistente e riproducibile 46 proteine, molte delle quali sono già state associate a importanti processi della carcinogenesi come l'angiogenesi o la modificazione della matrice extracellulare. Di queste proteine, 21 sono classificate come proteine secrete secondo i database Human Protein reference e GeneCards, mentre le rimanenti sono classificate come citoplasmatiche. Dato che, nonostante le obiezioni precedentemente illustrate, il rilevamento delle proteine classificate come citoplasmatiche potrebbe essere legato anche a processi di danno e morte cellulare, l'attenzione è stata rivolta prevalentemente sul primo gruppo.

Undici delle 21 proteine classificate come secrete sono già state associate con il cancro del pancreas, osservazione che ulteriormente indica la validità dell'approccio scelto per identificare proteine importanti nello scenario della malattia. Questo gruppo comprende: MMP-1, MMP-7, TIMP1, SERPINE2, TGFBI, MAC-2BP, clusterin, glicerol-3-fosfato deidrogenasi, syndecan-1, TSP-1, ed uPA. Si ritiene che molte di queste proteine giochino un ruolo nell'adesione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, così come nei processi di degradazione e rimodellamento della stessa matrice extracellulare, promuovendo in tal modo i processi di invasione e metastatizzazione<sup>30-42</sup>.

Le restanti 10 proteine non sono state precedentemente associate al cancro del pancreas. Questo gruppo comprende CSPG2/versican, Mac25/angiomodulin, IGFBP-1, HSPG2/perlecan, syndecan-4, FAM3C, APLP2, ciclofilina B,  $\beta$ 2 microglobulina e ICA69. I dati ottenuti al MudPIT sono stati convalidati utilizzando due di queste, CSPG2/versican e Mac25/angiomodulina, dal momento che erano tra le proteine maggiormente rappresentate nei nostri campioni in base al numero di peptidi rilevati nei surnatanti e che per esse erano disponibili anticorpi adatti per la loro rilevazione.

L'immunoistochimica per CSPG2/versican su campioni di adenocarcinoma duttale primario mostra cellule tumorali negative circondate da un denso stroma immunopositivo. Ad una prima analisi, questa osservazione potrebbe suggerire che i fibroblasti dello stroma siano l'unica fonte di versican *in vivo*, ed in effetti i fibroblasti sono ad oggi considerati come i principali produttori di CSPG2/versican<sup>43</sup>. Anche le cellule endoteliali possono contribuire

alla sua deposizione nella matrice extracellulare, dato che la sua espressione in tessuti adulti risulta maggiore nelle strutture vascolari<sup>43-46</sup>. La dimostrazione qui fornita che CSPG2/versican è prodotto, ed immediatamente rilasciato, anche dalle cellule tumorali sfida la tesi corrente secondo la quale i fibroblasti sarebbero la sola o la predominante fonte di questa molecola. Le evidenze a supporto di questo nuovo punto di vista derivano sia dal rinvenimento di versican nei surnatanti di cellule tumorali, sia dall'impianto in topi nudi di cellule tumorali incluse in Matrigel, impianti nei quali l'immunoistochimica ha mostrato l'accumulo di versican all'interfaccia tra le cellule e la matrice inerte, prima della sua diffusione nella matrice stessa. Le stesse cellule esprimono l'RNA messaggero per questo proteoglicano ma non vengono marcate dall'anticorpo specifico anti-versican, combinazione che suggerisce una bassa concentrazione intracellulare di versican e compatibile con un rapido rilascio delle molecole di nuova sintesi. Che la situazione sia simile anche nel tumore primario è suggerito anche dai risultati di un precedente studio dei profili di espressione rispettivamente di campioni di stroma desmoplastico e di cellule tumorali primarie<sup>27</sup>. In quello studio, la componente stromale aveva mostrato una sovraespressione dei tre proteoglicani biglycan, decorina e versican, ma solo CSPG2/versican era sovraespresso nelle cellule tumorali. Questo risultato è stato ulteriormente riconfermato nel presente studio tramite l'esecuzione di RT-PCR su campioni di ago-aspirati dalle masse tumorali di tre pazienti. Inoltre, il rilevamento dei trascritti di versican in 14 su 15 cancro primari reimpiantati in topi nudi suggerisce a sua volta che l'espressione di versican, e presumibilmente la sua secrezione, sia una caratteristica piuttosto comune tra le cellule tumorali pancreatiche. Un dato importante da notare è che CSPG2/versican non ha un ruolo meramente strutturale, ma sembra avere anche compiti funzionali con effetti sulla modulazione dell'attività cellulare<sup>47</sup>.

Mac25/angiomodulina è un membro della famiglia delle insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) e non era stata precedentemente associata al cancro del pancreas; tuttavia era già stata descritta la sua presenza in altri tumori. Sembra essere coinvolta nella modulazione dell'angiogenesi ed accumularsi nei vasi tumorali, promuovere l'adesione delle cellule endoteliali al collagene di tipo IV e legarsi a sua volta ai proteoglicani eparan-solfati<sup>22, 48, 49</sup>. Recentemente è stata dimostrata la sua interazione con un preciso gruppo di chemochine regolanti la migrazione dei linfociti<sup>50</sup>. E' stato riportato che, nel carcinoma coloretale, Mac25/angiomodulina si accumula nei piccoli vasi sanguigni e capillari adiacenti o all'interno di masse tumorali invasive, mentre la

maggioranza delle cellule tumorali non esprime livelli di proteina rilevabili con l'immunoistochimica<sup>51</sup>. Se *in vivo* Mac25 sia prodotta dalle cellule tumorali o endoteliali rimane una questione aperta. Nel presente studio si è dimostrato che Mac25/angiomodulina rappresenta una delle principali proteine rilasciate dalle cellule di cancro del pancreas. Questo dato è stato confermato dal western blot sui surnatanti ottenuti da diverse linee cellulari, dall'immunoistochimica su cellule Suit-2 impiantate in topi nudi e su campioni di cancro del pancreas. In questi ultimi, Mac25 è stata osservata all'interno dei piccoli vasi e delle cellule tumorali comprese in zone altamente desmoplastiche. Questi risultati non contraddicono l'evidenza che le cellule endoteliali o della muscolatura liscia associata ai vasi producono a loro volta questo fattore, mostrano tuttavia la necessità di un'attenta valutazione del relativo contributo di ciascun tipo cellulare.

Il ruolo centrale dell'urochinasi attivatore del plasminogeno (uPA) nel promuovere l'invasione tumorale è ad oggi ben stabilito: uPAR localizza l'attività enzimatica di uPA sulla superficie cellulare a contatto con le altre cellule e la matrice extracellulare, e la plasmina conseguentemente prodotta in questi siti media la proteolisi aspecifica che facilita la migrazione delle cellule tumorali attraverso le strutture tissutali<sup>52</sup>. Poiché l'attività proteolitica di uPA può tagliare il suo stesso recettore sia *in vivo* che *in vitro*, la misurazione di suPAR nel sangue o nelle urine può essere un indicatore più accessibile e affidabile dell'attività del sistema uPA in vivo<sup>53</sup>. L'analisi effettuata sui campioni a disposizione ha dimostrato come nei pazienti di adenocarcinoma duttale del pancreas i livelli serici di suPAR siano significativamente più elevati rispetto a quelli riscontrabili nelle altre patologie che pongano un problema di diagnosi differenziale rispetto al carcinoma duttale.

IGFBP-1 è un altro membro della famiglia cui anche Mac25 appartiene identificato dall'analisi MudPIT; è stato recentemente associato ad un maggiore rischio di malattie neoplastiche in una famiglia<sup>54</sup>.

HSPG2/perlecan è un altro proteoglicano eparan-solfato, componente principale delle membrane basali e dei tessuti connettivi ed il blocco della sua espressione inibisce la crescita tumorale e la neovascolarizzazione in xenografts di carcinoma del colon umano ed allografts di melanoma di topo<sup>55</sup>.

Cellule transfettate con il cDNA di Syndecan-4 acquisiscono la capacità di legare il collagene e mostrano una ridotta capacità invasiva<sup>56</sup>.

FAM3C è un membro di una famiglia genica di molecole affini alle citochine recentemente clonate<sup>57</sup>; come prosecuzione del presente studio è in corso il clonaggio e l'espressione della proteina ricombinante, nonché la messa a punto di anticorpi policlonali contro questa stessa molecola allo scopo di indagare il suo ruolo nel cancro del pancreas.

APLP2 (proteina simile al precursore dell'amiloide  $\beta$  A4) è una proteina fortemente omologa alla proteina precursore dell'amiloide (APP), che è stata descritta esser espressa dalle cellule di cancro del pancreas<sup>58</sup>.

La ciclofinila B è stata suggerita come antigene tumorale riconosciuto da specifici linfociti "(HLA)-A24-restricted" e linfociti T citotossici antitumorali<sup>59</sup>.

La  $\beta$ -2 microglobulina è stata identificata come responsabile dell'induzione di apoptosi caspasi-dipendente in una linea cellulare leucemica<sup>60</sup>; resta ancora da dimostrare se questo possa avvenire nelle cellule del sistema immunitario di pazienti con il cancro del pancreas. Di ICA 69 si conosce soltanto il fatto che è fortemente espresso nel pancreas murino, dato raccolto mediante western blot<sup>61</sup>.

Il ruolo svolto da queste molecole è sconosciuto e il fatto che siano rilasciate da cellule di cancro del pancreas rappresenta una novità che richiede e stimola ulteriori analisi, per le quali tuttavia è necessario lo sviluppo di reagenti appropriati, quali ad esempio anticorpi specifici.

In conclusione, è stato dimostrato come l'applicazione della tecnologia MudPIT per l'analisi delle proteine rilasciate dalle cellule di cancro del pancreas costituisca un approccio rapido, sensibile e riproducibile in grado di identificare nuovi potenziali marcatori associati al tumore. La procedura è relativamente semplice, può essere automatizzata, non richiede reagenti costosi o tediosi passaggi preparativi e, cosa da non trascurare, richiede volumi minimi di campione. Tutto ciò rappresenta un notevole passo in avanti rispetto alle metodiche precedenti che, pur molto efficaci, non sono altrettanto efficienti, richiedendo maggiori quantità di campione e implicando procedimenti ben più lunghi<sup>62</sup>. E' stato inoltre dimostrato che, usando valori normalizzati dei punteggi assegnati dal programma SEQUEST, è possibile ottenere in modo riproducibile una valutazione semi-quantitativa dell'abbondanza relativa delle proteine presenti in soluzione, cosa che permette la caratterizzazione comparativa dei campioni raccolti. Questo dato è in accordo con i lavori più recenti, che riportano l'uso di altri parametri forniti da SEQUEST come indicatori dell'abbondanza relativa delle proteine<sup>63, 64</sup>. Naturalmente, per una quantificazione

assoluta sarebbero necessari standard interni con isotopi stabili<sup>62, 65</sup>, ma simili tecniche richiedono costi maggiori ed una maggiore manipolazione del campione.

Oltre all'identificazione di nuove proteine rilasciate da cellule di cancro del pancreas, i presenti risultati evidenziano il ruolo dei proteoglicani e delle metalloproteasi di matrice nella regolazione del microambiente neoplastico. I proteoglicani rilasciati dalle cellule di cancro del pancreas sono in grado di interagire con diverse specie proteiche, con un ruolo centrale nei complessi, e per larga parte ignoti, processi che regolano la vasculogenesi e la migrazione di cellule immunitarie nei tumori del pancreas. Come ulteriore aggiunta, le metalloproteasi di matrice sono a loro volta in grado di interagire con i proteoglicani e mediare da loro il rilascio di fattori funzionali, in un contesto di complesse interazioni incrociate tra le molecole della matrice extracellulare che ne regola la crescita, la degradazione ed il rimodellamento.

## Bibliografia

1. Barnard, J. A. in *Gastrointestinal Cancers* (ed. Rustgi, A. K.) 33-54 (Saunders, New York, 2003).
2. Liotta, L. A. & Paweletz, C. P. in *The Cancer Handbook* (ed. Alison, M.) 225-234 (Nature Publishing Group, London, 2002).
3. Castells, A. & Rustgi, A. K. in *Gastrointestinal Cancers* (ed. Rustgi, A. K.) 69-79 (Saunders, New York, 2003).
4. Golub, T. R. et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-7 (1999).
5. Ross, D. T. et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24, 227-35 (2000).
6. Bittner, M. et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406, 536-40 (2000).
7. Perou, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-52 (2000).
8. Diehn, M., Eisen, M. B., Botstein, D. & Brown, P. O. Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nat Genet* 25, 58-62 (2000).
9. Cravatt, B. F. & Sorensen, E. J. Chemical strategies for the global analysis of protein function. *Curr Opin Chem Biol* 4, 663-8 (2000).
10. Griffin, T. J. & Aebersold, R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. *J Biol Chem* 276, 45497-500 (2001).
11. Corthals, G. L., Wasinger, V. C., Hochstrasser, D. F. & Sanchez, J. C. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* 21, 1104-15 (2000).
12. Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y. & Aebersold, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9390-5 (2000).
13. Wolters, D. A., Washburn, M. P. & Yates, J. R., 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* 73, 5683-90 (2001).

14. Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates, J. R., 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 19, 242-7 (2001).
15. Wu, C. C. & Yates, J. R., 3rd. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol* 21, 262-7 (2003).
16. Moore, P. S. et al. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* 439, 798-802 (2001).
17. Sorio, C. et al. Mucinous cystic carcinoma of the pancreas: a unique cell line and xenograft model of a preinvasive lesion. *Virchows Arch*, in press [Epub ahead of print]  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15688169](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15688169) (2005).
18. Kratchmarova, I. et al. A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. *Mol Cell Proteomics* 1, 213-22 (2002).
19. Durr, E. et al. Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture. *Nat Biotechnol* 22, 985-992 (2004).
20. Carr, S. et al. The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data. *Mol Cell Proteomics* 3, 531-3 (2004).
21. Mauri, P. L. in 16th International Mass Spectrometry Conference (Edinburgh, 2003).
22. Akaogi, K. et al. Specific accumulation of tumor-derived adhesion factor in tumor blood vessels and in capillary tube-like structures of cultured vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8384-9 (1996).
23. Cattaneo, M. et al. SEL1L expression in pancreatic adenocarcinoma parallels SMAD4 expression and delays tumor growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 22, 6359-68 (2003).
24. Masucci, M. T., Pedersen, N. & Blasi, F. A soluble, ligand binding mutant of the human urokinase plasminogen activator receptor. *J Biol Chem* 266, 8655-8 (1991).
25. Ronne, E. et al. Quantitation of the receptor for urokinase plasminogen activator by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 167, 91-101 (1994).

26. Resnati, M. et al. Specific immunofluorimetric assay detecting the chemotactic epitope of the urokinase receptor (uPAR). *J Immunol Methods* 308, 192-202 (2006).
27. Crnogorac-Jurcevic, T. et al. Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene* 20, 7437-46 (2001).
28. Sorio, C. et al. Successful xenografting of cryopreserved primary pancreatic cancers. *Virchows Arch* 438, 154-8 (2001).
29. Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K. & Markovitz, D. M. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol* 5, 59-63 (2003).
30. Ellenrieder, V. et al. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer* 85, 14-20 (2000).
31. Kitamura, N. et al. High collagenolytic activity in spontaneously highly metastatic variants derived from a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) in nude mice. *Clin Exp Metastasis* 18, 561-71 (2000).
32. Bramhall, S. R., Neoptolemos, J. P., Stamp, G. W. & Lemoine, N. R. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 182, 347-55 (1997).
33. Buchholz, M. et al. SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo. *Cancer Res* 63, 4945-51 (2003).
34. Schneider, D. et al. Induction and expression of betaig-h3 in pancreatic cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1588, 1-6 (2002).
35. Tinari, N. et al. Identification of the tumor antigen 90K domains recognized by monoclonal antibodies SP2 and L3 and preparation and characterization of novel anti-90K monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 232, 367-72 (1997).
36. Kunzli, B. M. et al. Influences of the lysosomal associated membrane proteins (Lamp-1, Lamp-2) and Mac-2 binding protein (Mac-2-BP) on the prognosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 94, 228-39 (2002).
37. Xie, M. J. et al. Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas* 25, 234-8 (2002).



38. Huang, C. J., Severin, E. & Blum, M. Flow-cytometric determination of dehydrogenase activities in primary human gastrointestinal tumor cell lines. *Anal Cell Pathol* 6, 93-103 (1994).
39. Conejo, J. R. et al. Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers. *Int J Cancer* 88, 12-20 (2000).
40. Kasper, H. U. et al. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch* 438, 116-20 (2001).
41. Albo, D., Berger, D. H. & Tuszynski, G. P. The effect of thrombospondin-1 and TGF-beta 1 on pancreatic cancer cell invasion. *J Surg Res* 76, 86-90 (1998).
42. Cantero, D. et al. Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 75, 388-95 (1997).
43. Cattaruzza, S. et al. Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration, and neoangiogenesis in vitro. *J Biol Chem* 277, 47626-35 (2002).
44. Wight, T. N., Lara, S., Riessen, R., Le Baron, R. & Isner, J. Selective deposits of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries. *Am J Pathol* 151, 963-73 (1997).
45. Aspberg, A., Adam, S., Kostka, G., Timpl, R. & Heinegard, D. Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J Biol Chem* 274, 20444-9 (1999).
46. Isogai, Z. et al. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem* 277, 4565-72 (2002).
47. Pejler, G. et al. Secretion of macrophage urokinase plasminogen activator is dependent on proteoglycans. *Eur J Biochem* 270, 3971-80 (2003).
48. Sato, J. et al. Identification of cell-binding site of angiomodulin (AGM/TAF/Mac25) that interacts with heparan sulfates on cell surface. *J Cell Biochem* 75, 187-95 (1999).
49. Kishibe, J. et al. Structural requirements of heparan sulfate for the binding to the tumor-derived adhesion factor/angiomodulin that induces cord-like structures to ECV-304 human carcinoma cells. *J Biol Chem* 275, 15321-9 (2000).
50. Nagakubo, D. et al. A high endothelial venule secretory protein, mac25/angiomodulin, interacts with multiple high endothelial venule-associated molecules including chemokines. *J Immunol* 171, 553-61 (2003).

51. Adachi, Y. et al. Expression of angiomodulin (tumor-derived adhesion factor/mac25) in invading tumor cells correlates with poor prognosis in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 95, 216-22 (2001).
52. Fernebro, E. et al. Prognostic importance of the soluble plasminogen activator receptor, suPAR, in plasma from rectal cancer patients. *Eur J Cancer* 37, 486-91 (2001).
53. Stephens, R. W. et al. ELISA determination of soluble urokinase receptor in blood from healthy donors and cancer patients. *Clin Chem* 43, 1868-76 (1997).
54. Hill, A. S., MacCallum, P. K., Young, B. D. & Lillington, D. M. Molecular cloning of a constitutional t(7;22) translocation associated with risk of hematological malignancy. *Genes Chromosomes Cancer* 38, 260-4 (2003).
55. Sharma, B. et al. Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 102, 1599-608 (1998).
56. Liu, W. et al. Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules. Syndecans and glypican have distinct functions. *J Biol Chem* 273, 22825-32 (1998).
57. Zhu, Y. et al. Cloning, expression, and initial characterization of a novel cytokine-like gene family. *Genomics* 80, 144-50 (2002).
58. Hansel, D. E. et al. Increased expression and processing of the Alzheimer amyloid precursor protein in pancreatic cancer may influence cellular proliferation. *Cancer Res* 63, 7032-7 (2003).
59. Tamura, M. et al. Identification of cyclophilin B-derived peptides capable of inducing histocompatibility leukocyte antigen-A2-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 92, 762-7 (2001).
60. Gordon, J., Wu, C. H., Rastegar, M. & Safa, A. R. Beta2-microglobulin induces caspase-dependent apoptosis in the CCRF-HSB-2 human leukemia cell line independently of the caspase-3, -8 and -9 pathways but through increased reactive oxygen species. *Int J Cancer* 103, 316-27 (2003).
61. Pilon, M., Peng, X. R., Spence, A. M., Plasterk, R. H. & Dosch, H. M. The diabetes autoantigen ICA69 and its *Caenorhabditis elegans* homologue, ric-19, are conserved regulators of neuroendocrine secretion. *Mol Biol Cell* 11, 3277-88 (2000).
62. Martin, D. B. et al. Quantitative proteomic analysis of proteins released by neoplastic prostate epithelium. *Cancer Res* 64, 347-55 (2004).

63. Liu, H., Sadygov, R. G. & Yates, J. R., 3rd. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem* 76, 4193-201 (2004).
64. Gao, J., Opiteck, G. J., Friedrichs, M. S., Dongre, A. R. & Hefta, S. A. Changes in the protein expression of yeast as a function of carbon source. *J Proteome Res* 2, 643-9 (2003).
65. Gygi, S. P. et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 17, 994-9 (1999).